

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁶: G01N 33/543, B01L 3/00, G01N 33/53	A1	(11) International Publication Number: WO 96/10747 (43) International Publication Date: 11 April 1996 (11.04.96)
(21) International Application Number: PCT/US95/12462 (22) International Filing Date: 29 September 1995 (29.09.95) (30) Priority Data: 08/315,364 30 September 1994 (30.09.94) US (71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US). (72) Inventors: HANSMANN, Douglas, D.; 185 Acorn Lane, Libertyville, IL 60048 (US). GRACE, John, P.; 38082 North Academy Drive, Lake Villa, IL 60046 (US). LOWERY, Michael, G.; 33720 Royal Oak Lane, No. 201, Wildwood, IL 60030 (US). OOSTA, Gary, M.; 5377 Ashwood Lane, Gurnee, IL 60031 (US). LOOMIS, Nell, W.; 1730 S. Wisconsin Avenue, Racine, WI 53403 (US). SHAIN, Eric, B.; 459 Grove Street, Glencoe, IL 60022 (US). SCHAPIRA, Thomas, G.; 21616 107th Street, Bristol, WI 53104 (US). (74) Agents: STEELE, Gregory, W. et al.; Abbott Laboratories, CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US).		(81) Designated States: CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the</i> <i>claims and to be republished in the event of the receipt of</i> <i>amendments.</i>
(54) Title: DEVICES AND METHODS UTILIZING ARRAYS OF STRUCTURES FOR ANALYTE CAPTURE (57) Abstract <p>The present invention relates to analytical devices for determining the presence or amount of an analyte in a test sample. The analytical devices comprise an inlet port, a vent, a channel, and an array of structures. The structures have immobilized reagent covalently or non-covalently attached to the surface of the structures. The immobilized reagent captures analyte in the test sample where it is detected by a detection system. The present invention also provides methods and reagents for performing assays utilizing the analytical devices of the present invention. The present invention also provides methods of manufacturing the analytical devices of the present invention.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506991

(43) 公表日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

F I

G 0 1 N 33/543

5 2 1

G 0 1 N 33/543

5 2 1

C 1 2 Q 1/00

C 1 2 Q 1/00

Z

G 0 1 N 33/48

G 0 1 N 33/48

H

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願平8-512030
(86) (22) 出願日 平成7年(1995) 9月29日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 3月28日
(86) 国際出願番号 PCT/US95/12462
(87) 国際公開番号 WO96/10747
(87) 国際公開日 平成8年(1996) 4月11日
(31) 優先権主張番号 08/315, 364
(32) 優先日 1994年9月30日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ
アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、
アボット・パーク、アボット・パーク・ロ
ード・100、チャド・0377/エイ・ビー・
6・デュー2
(72) 発明者 ハンスマン, ダグラス・デイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ
ティビル、エイコーン・レイン・185
(72) 発明者 グレース, ジョン・ビー
アメリカ合衆国、イリノイ・60046、レイ
ク・ピラ、ノース・アカデミー・ドライ
ブ・38082
(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 構造体アレイを利用して分析物を捕捉する装置および方法

(57) 【要約】

本発明は、被験サンプル中の分析物の存在もしくは量を決定するための分析装置に関するものである。その分析装置は、入口ポート、ベント、流路および構造体アレイを有する。構造体の表面には固定化試薬が共有結合的または非共有結合的に付着している。固定化試薬は被験サンプル中の分析物を捕捉し、そこで分析物が検出系によって検出される。本発明はさらに、本発明の分析装置を利用するアッセイを行うための方法および試薬をも提供するものである。本発明はさらに、本発明の分析装置を製造する方法をも提供するものである。

【特許請求の範囲】

1. 被験サンプル中の分析物の存在もしくは量を決定する分析装置であって、
共有結合的もしくは非共有結合的に付着した固定化試薬を提供する表面を有し、
該固定化試薬が、分析物、分析物類似体、補助結合要素および標識試薬からなる群から選択されるものに結合することができる構造体アレイと

前記分析物、分析物類似体、補助結合要素または標識試薬を含有する前記被験サンプルが通って流れ、該分析物、分析物類似体、補助結合要素または標識試薬が幅全体に拡散し、前記固定化試薬に結合する複数の流路と、

を併せ持つ分析装置。

2. 前記分析物が、抗原、ヌクレオチドアレイ、レクチンまたはアビジンからなる群から選択され、前記固定化試薬が抗体、補体ヌクレオチドアレイ、炭水化物またはビオチンから成る群から選択される請求項1に記載の分析装置。

3. 前記構造体が、コポリマー、混合物、積層物、金属被覆ホイル、金属被覆薄膜、あるいはポリオレフィン、ポリエステル

ル、スチレン含有ポリマー、ポリカーボネート、アクリル酸ポリマー、塩素含有ポリマー、アセタールホモポリマーおよびコポリマー、セルロース性化合物およびそのエステル、硝酸セルロース、フッ素含有ポリマー、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルエーテルケトン、硫黄含有ポリマー、ポリウレタン類、珪素含有ポリマー、ガラスおよびセラミック材料からなる群から選択される材料に金属を堆積したものから製造されたものである請求項1に記載の分析装置。

4. 前記構造体が類似の形状を持ち、該形状が、菱形、六角形、八角形、矩形、正方形、円形、半円形、三角形およびエリプス (elipses) からなる群から選択される請求項1に記載の分析装置。

5. 前記構造体アレイが、被験サンプル流方向に対してジグザグに並んでいる請求項4に記載の分析装置。

6. 赤血球凝集剤で処理したセパレータをさらに有する請求項1に記載の分析装置。

7. 前記構造体アレイが、複数の固定化試薬を有して、前記被験サンプル中の

複数の分析物について調べるものである請求項1に記載の分析装置。

8. サンプル添加用のチャンバをさらに有し、該チャンバが複数の経路を有し、該経路のそれぞれが構造体アレイにつながっており、該経路は前記被験サンプルを前記チャンバから前記構造体アレイまで輸送するものである請求項1に記載の分析装置。

9. 被験サンプル中の分析物の存在もしくは量を決定する分析装置であって、
入口ポートおよびベント；

構造体アレイ（表面が、共有結合的もしくは非共有結合的に該構造体の該表面に付着した固定化試薬を提供するものであり、分析物、分析物類似体および補助結合要素からなる群から選択されるものを結合することができる構造体アレイと

前記分析物、分析物類似体または補助結合要素を含有する前記被験サンプルが通って流れ、該分析物、分析物類似体または補助結合要素が幅全体に拡散し、前記固定化試薬に結合する複数の流路と、

前記固定化試薬で信号を発生させることができる検出可能標識に接合した特異的結合要素を有してなる標識試薬と、

を併せ持つ分析装置。

10. 被験サンプル中の分析物の存在または量を求める方法であって、

入口ポート、ベント、複数の流路および構造体アレイを有する分析装置であって、前記各構造体は該構造体の少なくとも一つの表面に、分析物、分析物類似体、補助結合要素および標識試薬からなる群から選択されるものを結合することができる固定化試薬を有する分析装置を用意し、

前記被験サンプルを前記入口ポートに加え、前記複数の流路が前記被験サンプルを前記入口ポートから前記構造体アレイに移動させ；

前記被験サンプルを前記流路に進入させ、前記分析物を前記流路の幅全体に拡散させ、そこで前記固定化試薬を前記分析物に結合させ、

検出可能標識に接合した特異的結合要素を有する分析物検出系によって前記分

析物を検出し、該検出可能標識は前記捕捉部位で信号を発生させることができ、前記検出によって前記被験サンプル中に存在する前記分析物の存在もしくは量を測定する方法。

11. 被験サンプル中の分析物の存在または量を求める方法

であって、

被験サンプル入口ポート、ベントおよび複数の流路を有する構造体アレイを有する分析装置であって、前記構造体の前記表面に、ポリアニオン性材料を結合させることができるポリカチオン性材料が固定化されており、該ポリアニオン性材料は分析物特異的結合要素に結合している分析装置を用意し、

前記ポリアニオン性材料と前記被験サンプルとを混合することで、前記特異的結合要素前記分析物に結合させ、該混合物を前記構造体アレイまで移動させ、

前記ポリカチオン性材料に固定化した前記被験サンプル中の分析物の存在または量を検出する方法。

12. 原型から分析装置を製造する方法であって、前記原型が構造体アレイを有し、該アレイ間には1以上の流路があり、該方法がレーザー処理、LIGA、微細加工、フォトリソグラフィ、反応性イオンエッチング、イオンビームフライス加工、型押し、電鑄、電気メッキ、射出成形、圧縮成形、鑄造または反応射出成形からなる群から選択されるものである方法。

【発明の詳細な説明】

構造体アレイを利用して分析物を捕捉する装置および方法1. 発明の属する技術分野

本発明は、被験サンプル中の分析物を検出するための装置に関する。該装置は、装置中の構造体のアレイを利用して、分析物を捕捉するものである。

2. 発明の背景

被験サンプル中の分析物の定性的または定量的測定は、生理的および非生理的状态の診断において常に重要な問題である。試薬と混和している被験サンプルを分析することで、機器の用いたり、機器を用いずに検出可能な信号が得られる。

被験サンプル中の各種分析物の測定を行う方法および装置が提供されている。本発明の趣旨において特に対象となるものは、小型の使い捨て装置である。そのような装置は通常、細片またはトラック (track) 装置が関与するものである。

多孔質の装置は通常、装置を通過させて流体を運ぶ何らかの形の多孔質材料を使用するものである。これらの装置は通常、シート、細片、液浸棒などの形態である。細片装置は、表面積が大きく、孔径が小さいという利点を持つ。そのような材料を

利用する装置の欠点の一つは、装置形成においてプロセスがランダムであるために、多孔質材料にロット間の変動が生じ得るという点である。その変動により、装置の性能に差が生じ得る。

トラック装置は、容易に再現可能な均一表面を提供するものであるが、間隔が広すぎて、妥当な時間内に内部表面での分析物の拡散とその後の捕捉を行うことができない。

従って、トラック装置の寸法再現性と多孔質材料を用いる装置の小孔および大表面積を有する小型の使い捨て装置を作製することは有利であると考えられる。そうすれば、多孔質装置とトラック装置の問題は同時に解決されることが考えられる。

電子業界において小型装置を作製するには、いくつかの方法が利用されてきた。例えば、ムンヒマイヤーらの論文 (Munchmeyer et al., Rev. Sci. Instrum., 6

3(1)、713-721、(1992)) には、シンクロトン照射リソグラフィーを利用して原型 (マスター) を作製する、光学および電気微小部品製造の L I G A 技術が開示されている。エンゲルらの論文 (Angell et al., Scientific American, 248: 44-55(1983)) には、マイクロエレクトロニクス用シリコンウェハへの微細加工によるエッチングが記載されている。マンツらの論文 (Manz et al., Trends

in Analytical Chemistry, Vol. 10, No. 5, pp. 144-149, (1991)) には、より迅速なクロマトグラフィー分離および電気泳動分離を行うフローインジェクション分析および検出器セル用の再現性の良い微細加工単結晶シリコンおよびガラスが開示されている。

小型装置に向かう傾向は、電子業界に限ったものではない。サトーらの論文には (Sato et al., Sensors and Actuators, A21-A23, pp.948-953, (1990)) 、 2 つの異なった細胞群間の 1 : 1 細胞融合操作を同時に行うことができるマイクロメカニックスのシリコン装置が開示されている。微小チャンバで細胞の融合が奏功していることが認められている。

ナヤク (Nayak) に対する米国特許 4 7 8 9 6 2 8 号には、リガンド : アンチリガンドアッセイ用に表面積を大きくするための、孔底部から上方に伸びる互いに分離した複数の突出物が開示されている。その複数の分離した突出物は、相互に連絡する流路を形成している。しかしながら、突出部の寸法が大きく、流路の幅が大きいため、低濃度分析物を用いた微量アッセイや迅速な信号形成は行うことができない。

ワイルディングら (Wilding et al.) に対する W O 9 3 /

2 2 0 5 3 A 1 号には、被験サンプル中の分析物を検出する微細加工検出装置が開示されている。その装置は、投入口から伸びるマイクロメートル単位の流路を有する。流路は微細加工によってシリコン中に形成されたものである。結合部分が流路内面を覆っていて、分析物を検出する。

現在の分析技術、すなわち多孔質装置およびトラック装置は、十分なアッセイ性能を与える材料を提供するものではない。微量の流体を許容できる速度で流し

、許容できる効率で分析物を捕捉することができる再現可能は装置が必要とされている。図面の簡単な説明

図1には、菱形構造体のアレイを示してある。構造体の表面は分析物捕捉部位である。図中の矢印は、装置での流体の流れの方向を表す。このアレイにおける菱形の列は、流体流動方向に対してジグザグ配置となっている。

図2には、本発明の分析装置で使用される六角形構造体のアレイを示してある。

図3には、本発明の分析装置で使用される三角形構造体のアレイを示してある。

図4には、本発明の分析装置で使用される円形構造体のアレイを示してある。

図5には、本発明の分析装置を用いて実施例1で実施されるh T S Hアッセイの結果を示してある。

図6には、本発明の分析装置の1実施態様を示してある。

発明の概要

本発明は、被験サンプル中の分析物の存在もしくは量を決定するための分析装置であって、試薬固定化用の部位を提供する表面を有する構造体のアレイを有してなる装置に関するものである。固定化試薬は、該構造体表面に共有結合的もしくは非共有結合的に付着しており、分析物、分析物類似体、補助結合要素もしくは標識試薬を結合することができる。本発明の分析装置はさらに、複数の流路を有し、分析物、分析物類似体、補助結合要素もしくは標識試薬を含む被験サンプルが該流路を流れ、分析物、分析物類似体、補助結合要素もしくは標識試薬が該流路の幅全体に拡散して、固定化試薬と結合することができる。検出可能な標識に接合した特異的結合要素を有する標識試薬が、被験サンプルに存在する分析物の存在もしくは量を決定する信号を出す。

本発明はさらに、本発明の分析装置を利用する方法ならびにそのような装置を製造する方法に関するものである。

発明の詳細な説明定義

本発明の各種実施の態様について説明する前に、本明細書で使用のいくつかの用語を定義する。

「補助的特異的結合要素」とは、標識試薬もしくは固定化試薬の特異的結合要素に加えてアッセイで使用される、いかなる特異的結合要素をも指す。アッセイでは 1 以上の補助的特異的結合要素を使用することができる。例えば、補助的特異的結合要素は、分析物自体が標識試薬に直接付着しない場合などに、標識試薬を対象分析物に結合させることができる。別の形態としては、補助的特異的結合要素は、分析物自体が固定化試薬に直接付着できないと考えられる場合などに、固定化試薬を対象分析物に結合させることができる。補助的特異的結合要素は、サンプルに付加して、あるいは別個の試薬として付加してアッセイ装置に組み入れることができる。

「分析物」もしくは「対象分析物」とは、少なくとも 1 個のエピトープもしくは結合要素位を有する検出もしくは測定すべき化合物もしくは組成物を指す。天然の分析物特異的結合要素が存在するか、あるいは分析物特異的結合要素を製造することができるいかなる物質も分析物たり得る。分析物には、毒物、

有機化合物、蛋白、脂質、脂肪酸、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホルモン、糖、ステロイド、ビタミン、ドラッグ（治療用および不正な目的用に投与されるものを含む）ならびに上記物質のいずれかの代謝物もしくは該物質に対する抗体などがあるが、これらに限定されるものではない。「分析物」という用語はさらに、抗原性物質、ハプテン、抗体、巨大分子およびこれらの組み合わせをも含むものである。

「分析物類似体」とは、分析物特異的結合要素と交差反応するが、その程度は分析物自体より高いかもしくは低い可能性のある物質である。分析物類似体には、分析物類似体を対象分析物と共通の少なくとも 1 個のエピトープ部位を有する限りにおいて、分析物の修飾物や、分析物分子の断片化部分もしくは合成部分などがあり得る。分析物類似体の例としては、分析物分子全体の少なくとも 1 個の

エピトープを複製していることで、分析物類似体が分析物特異的結合要素に結合することができる合成ペプチドアレイがある。

「毛管」とは、空隙を囲む固体表面であって、その空隙では適正な表面張力の液体によって空気が優先的に置換され得るものを指す。毛管現象の機構は、系の表面自由エネルギーによっ

て決まる。毛管を通して液体の自然拡散が起こるには、系の表面自由エネルギーが拡散プロセス中に低下しなければならない。本発明で使用される装置では、対象の生体液に適した固体表面を選択することによって、そうすることができる。

「捕捉部位」とは、固定化試薬と分析物との間で特異的結合反応が起こるような構造体の一定部分または所定の部分を指す。

「チャンバ」とは、毛管ではない所定寸法の封止空間すなわち空洞を指す。チャンバには入口および出口の開口を設けることができる。チャンバは、毛管力または差圧によって充填することができる。特定チャンバの寸法を制御することで、試薬添加、流量、インキュベーション、反応領域または検出を制御することができる。さらに、試薬を共有結合的もしくは非共有結合的にチャンバ表面に付着させることができる。

「流路」とは、装置の隣接する構造体間の空間を指す。流路は毛管であることもできる。一般に、流路は入口ポート、他の毛管またはチャンバに連絡している。流路長さは、分析物測定および検出ができるだけの長さのものである。

「接合」とは、ある部分が別の部分と化学的に結合して接合体を生成することを指す。蛋白に対する共有結合的接合のため

のカップリング剤については、米国特許5053520号（参照により本明細書に全体を組み入れる）に記載されている。酵素を抗体に結合させるホモ二官能性カップリング剤も、1992年4月30日公開のPCT公開番号WO 92/07268号に記載のように、当業界で知られている。

「カップリング剤」とは、二官能性の架橋またはカップリング剤、すなわち2個の反応性の基もしくは「末端」（中間部分によって繋がれている場合もある）

を有する分子を指す。反応性末端は、各種官能基であることができ、それには例えば、*n*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) 活性エステル、イミドエステル、アルデヒド、エポキシド、スルホニルハライド、イソシアネート、イソチオシアネートおよびニトロアリールハライドなどのアミノ反応性末端；ならびにピリジルジスルフィド、マレイミド類、チオフタルイミド類および活性ハロゲンなどのチオール反応性末端などがあるが、これらに限定されるものではない。ヘテロ二官能性架橋試薬は、アミノ反応性末端とカルボキシル反応性末端などの2個の異なった反応性末端を有するものであるが、ホモ二官能性試薬は各末端に同様の反応性部分を有するものである。

本発明で使用される市販のヘテロ二官能性試薬には、*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (MBS)、スクシニミジル4-(*N*-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC)、スクシニミジル4-(*p*-マレイミドフェニル)ブチレート (SMPB) マレイミド-NHS 活性エステルカップリング剤やそれらの誘導体を含むが、これらに限定されるものではない。その様な誘導体には、4-(*N*-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸スルホスクシニミジル (スルホ-SMCC)、*m*-マレイミドベンゾイルスルホコハク酸イミドエステル (スルホ-MBS) および4-(*p*-マレイミドフェニル)酪酸スルホスクシニミジル (スルホ-SMPB) などのスルホスクシニミジル誘導体を含む。

他のヘテロ二官能性試薬には、*N*-スクシニミジルプロモアセテートおよび*N*-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾネート (S I A B) などの市販の活性ハロゲン-NHS 活性エステルカップリング剤ならびにスルホスクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾネート (スルホ-S I A B) などのスルホスクシニミジル誘導体などがある。

カップリング剤の別の群は、*N*-スクシニミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP) などのヘテロ二官能性およびチオール開裂可能な薬剤である。*N*、*N*'-ジダンシル-L-シスチンおよびL-シスチンジメチルエス

テル・2 塩酸塩などのチオール開裂可能な薬剤も使用可能である。

「デッドゾーン」とは、流体が蓄積するかあるいは流体の流動が投入口から前方に移動して装置の検出部分へ進まない流路中の部分を指す。

「拡散」とは、対象物が周囲の流体分子の衝突によってランダムに運動することを指す。拡散により、対象物の高濃度側から低濃度側への、対象物の正味の移動が生じる。

「固定化試薬」とは、構造体表面に共有結合的または非共有結合的に付着した試薬を指す。固定化試薬は、浸漬、ペンによる書き込み、毛细管もしくは試薬ジェット印刷その他の好適な付与法を用いる付与などの当業界で公知の各種方法によって構造体表面に施すことができる。付与および付着の方法は、本発明において重要な点ではない。

一般に、固定化試薬は、構造体表面に共有結合的もしくは非共有結合的に付着して「捕捉部位」を形成する特異的結合要素である。通常、固定化試薬を選択して、分析物、標識試薬また

はそれらの錯体を結合させる。好ましい実施態様においては、固定化試薬は分析物に結合して、サンドイッチ錯体を形成する。固定化試薬を選択することで、分析物を直接結合させるかあるいは分析物に結合した補助的特異的結合要素によって分析物を間接的に結合させることができる。固定化試薬は、好適な付着法によって、アッセイ実施の前または実施中に構造体に固定化することができる。さらに、固定化試薬は流路を通過する分析物および／または標識試薬の移動を遅くすることができる。固定化試薬はさらに、流体によって除去し得るような形で構造体に付着するようにすることができる。さらに、捕捉部位は、例えば染料によって印を施して、捕捉部位に標識が固定化されていない場合であっても、構造体上の捕捉部位の位置を肉眼的にまたは機器的に把握することができる。染料がアッセイもしくはアッセイの構成要素を妨害しない限りにおいて、染料をその目的に使用することができる。

固定化試薬は、単一捕捉部位であるいは複数の捕捉部位で提供することができる。さらに、固定化試薬の形状を決定して各種形状を取らせることができる。す

なわち、各種形態の検出もしくは測定を行うことができる。別法として、固定化試薬を実

質的に均一な形で構造体のかなりの部分に分布させて、捕捉部位を形成することができる。捕捉部位での信号発生の程度は、被験サンプル中の分析物の量に関係する。

「入口ポート」または「導入ポート」または「サンプル入口」は、同義語である。それらは被験サンプルが分析装置中に導入される部位を指す。その部位は、装置の受容部分につながっている。装置の受容部分としては、チャンバ、毛管もしくは流路があり得る。

「標識試薬」とは、特異的結合要素に付着した検出可能な標識を有する物質を指す。付着は共有結合的もしくは非共有結合的であるが、付着の方法は本発明の重要な点ではない。標識試薬は、被験サンプル中の分析物の量に直接もしくは間接に関係する検出可能信号を発生させるものである。標識試薬の特異的結合要素成分を選択して、分析物に直接結合させるか、あるいは以下に詳述する補助的特異的結合要素によって分析物に間接的に結合させることができる。さらに、標識試薬は、固定化試薬に特異的に結合する特異的結合要素に付着した検出可能標識を有することができる。標識試薬は被験装置中に組み入れることができ、被験サンプルと組み合わせて被験溶液を形成するこ

とができ、被験サンプルとは別個に装置に負荷することができ、あるいは捕捉部位で予め堆積させておくかまたは可逆的に固定化することができる。さらに、特異的結合要素を、好適な付着法によって、アッセイ実施の前もしくはアッセイ中に標識することができる。

「標識」もしくは「標識化」は、肉眼的または機器的手段によって検出可能な信号を発生させることができる物質を指す。本発明での使用に好適な各種標識には、化学的手段または物理的手段によって信号を出す標識などがある。そのような標識には、酵素および基質；色原体；触媒；蛍光化合物；化学発光化合物；放射性標識；金、セレンなどのコロイド状非金属粒子、染色プラスチックもしくは

染色微生物などの染色もしくは着色粒子、着色もしくは着色可能な有機ポリマーラテックス粒子、ならびにリボソームその他の直接肉眼で観察できる物質を含む媒体等があり得る。コロイド状金属および染料粒子は、米国特許4313734号および同4373932号に開示されている。非金属性コロイド状物の製造および使用については、米国特許4954452号に開示されている。標識として使用するための有機ポリマーラテックス粒子は、米国特許4252459号に開示されている。

標識が、肉眼で検出可能な着色有機ポリマーラテックス粒子などのようにそれ自体で検出可能な信号を発生させることができるか、または蛍光化合物のように機器的に検出可能であるか、あるいは酵素／基質信号発生系などの1以上の別の信号発生成分との併用で検出可能な限りにおいて、特定の標識の選択は、本発明においては重要な点ではない。標識試薬の標識または特異的結合要素成分を変えることで、各種の異なった標識試薬を生成することができる。さらに、選択を行う場合、検出すべき分析物および所望の検出手段を考慮することは、当業者には明らかである。

本明細書で使用する「反応混合物」とは、被験サンプルならびにその他の被験サンプル中の分析物検出のための生物的、化学的および物理的物質および試薬の混合物である。反応混合物には、希釈剤および緩衝剤なども含まれ得る。

「信号発生成分」とは、別のアッセイ試薬または分析物と反応して分析物の存在を示し、肉眼的手段または機器的手段によって検出可能な反応生成物もしくは信号を発生させることができる物質を指す。本明細書で使用する「信号発生系」とは、所望の反応生成物または信号を発生させるのに必要なアッセイ試

薬の群を指す。例えば、1以上の信号発生成分を標識と反応させて、検出可能な信号を発生させることができる。例えば、標識が酵素の場合、その酵素を1以上の基質または別の酵素および基質と反応させて検出可能な反応生成物を生成することで、検出可能信号の増幅を行うことができる。

「特異的結合要素」とは、化学的もしくは物理的手段によって、別の分子と特

異的に結合する部分を指す。抗原・抗体特異的結合要素に加えて、他にもビオチンおよびアビジン、炭水化物およびレクチン、補体のヌクレオチドアレイ、補体のペプチドアレイ、エフェクターおよび受容体分子、酵素補因子および酵素、酵素阻害薬および酵素、ペプチドアレイおよびアレイもしくは蛋白全体に特異的な抗体、ポリマー酸および塩基、染料および蛋白結合剤、ペプチドおよび特異的蛋白結合剤（例：リボヌクレアーゼ、S-ペプチドおよびリボヌクレアーゼS-蛋白）などの特異的結合要素がある。ただし、これらに限定されるものではない。さらに、特異的結合要素には、分析物類似体または組換え技術もしくは分子工学によって形成される特異的結合要素などの元の特異的結合要素の類似体である分子も含まれ得る。特異的結合要素が免疫反応物である場合、それには例

えば抗体、抗原、ハプテンもしくはそれらの錯体があり得て、抗体を使用する場合には、それにはモノクローナルもしくはポリクローナル抗体、組換え蛋白もしくは抗体、キメラ抗体、それらの混合物もしくは断片、さらには抗体と他の特異的結合要素の混合物であり得る。そのような抗体の製造およびその特異的結合要素としての使用の好適さについての詳細は、当業者には公知である。

「構造体」とは、本発明の装置の基体層から生じる物理形状を指す。構造体の表面は大きい表面積を与えるものである。構造体は、構造体表面にある捕捉部位で十分な分析物捕捉を行えるようなパターンもしくはアレイで配置されている。構造体には各種形状を用いることができる。例えば、三角形構造体を利用して、分析物を捕捉することができる。さらに、同一装置中にいくつかの異なった形状を併用することができる。すなわち、同一装置中で三角形構造体と菱形構造体を用いて試薬を捕捉することができる。

「被験サンプル」とは、本発明を用いて検出する分析物を含むサンプルを指す。被験サンプルは分析物以外にも他の成分を含有することができ、液体、生体液もしくは液体中に可溶化することができる固体の物理的属性を有することができる。例えば

流動する液流などのあらゆる大きさもしくは容量のものとすることができる。被

験サンプルには、他の物質が分析物もしくは分析物類似体を妨害しない限りにおいて、分析物以外の物質が含まれていてもよい。被験サンプルの例としては、血清、血漿、食品、髄液、痰液、精液、羊水、尿、唾液、その他の体液、ならびに地下水もしくは廃水、土壌抽出物および残留農薬などの環境サンプルなどがあるが、これらに限定されるものではない。

発明の説明

本発明の装置は、構造体のアレイを利用して、被験サンプル中の分析物を捕捉するものである。構造体は列状に配置されて、流体輸送のためのほぼ均一な流路を与え、また表面積を大きくするものである。分析物は、被験サンプル中に拡散し、構造体表面に結合している特異的結合要素によって捕捉される。本発明の分析装置は、シート、液浸棒、細片、キュベットなどとして利用することができる。さらに、複数の分析物の存在もしくは量を1個の分析装置で求めることができる。本発明は好ましくは、装置が毛管現象もしくは差圧に基づいて装置を流れる流体の運動を駆動して、流体の測定、事象の計画的実施(staging)、試薬もしくは対象物(エンティティ)の捕捉、

反応時間、試薬の混合を制御したり、検出可能な信号を測定したりする装置および方法を提供するものである。流体が流れる経路を変えることによって、混合、インキュベーション、反応および検出などの各種作業を行うことができる。

1. 本発明の装置の製造方法

本発明の分析装置は、装置中の構造体アレイに基づいて、分析物を捕捉するものである。構造体は、材料のレーザー加工、型押し、リソグラフィー・ガルバノフォームンク・アブフォームンク(Lithographie Galvanoformung Abformung, LIGA)、電気メッキ、電鍍、フォトリソグラフィー、反応性イオンエッチング、イオンビームフライス加工、圧縮成形、鋳造、反応射出成形、射出成形および微細加工などの各種方法によって製造することができる。当然のことながら、本発明の構造体の製造に利用される方法は、その方法で多量の均一な構造体および装置が得られる限りにおいて、重要な点ではない。さらにその方法によって、構造体の表面積が大きいものとなり、互いに近接して配置されて、狭い流路を形成

するものでなければならない。流路が狭いことで、分析物の流体中での拡散が起こり、捕捉部位での分析物および／または標識試薬の捕捉効率が高くな

る。一般的かつ好ましくは、分析装置中の構造体は装置の基体層と同じ材料で製造する。

これらの方法はいずれも、原型を製造する技術から始まる。通常はツールをその原型から作り、それを用いて本発明の分析装置を大量生産するか、場合によっては本発明の分析装置として直接使用するだけの量で原型を製造することができる。

大量生産される構造体は、好ましくはあらゆる数のポリマー材料から製造する。それには、ポリプロピレンおよびポリエチレンなどのポリオレフィン；ポリエチレンテレフタレートなどのポリエステル；ポリスチレン、スチレンアクリロニトリルおよびアクリロニトリルブタンジエンスチレンなどのスチレン含有ポリマー；ポリカーボネート；ポリメチルメタクリレートおよびポリアクリロニトリルなどのアクリル酸ポリマー；ポリビニルクロライドおよびポリビニリデンクロライドなどの塩素含有ポリマー；アセタールホモポリマーおよびコポリマー；セルロース性化合物およびそのエステル；硝酸セルロース；ポリビニリデンフルオライド、ポリテトラフルオロエチレンなどのフッ素含有ポリマー；ポリアミド；ポリイミド；ポリエーテルエーテルケトン；ポリフェニレンスルフィドおよびポリエーテル

スルホンなどの硫黄含有ポリマー；ポリウレタン類；ポリジメチルシロキサンなどの珪素含有ポリマーなどがあるが、これらに限定されるものではない。さらに構造体は、上記材料のコポリマー、混合物および／または積層物；アルミニウムホイルなどの金属ホイル；金属被覆したフィルム；および上記材料上に金属を堆積させたもの；ならびにガラスおよびセラミック材料から製造することができる。

そのような方法の一つとして、エキシマレーザーなどのレーザーを利用してフォトマスクを照射して、フォトマスクを通過する光によって下の材料を研削する

ことで、材料基板に流路を形成することができる（サーセルらの報告（Sercel, J., et al., SPIE Proceedings, Vol.998, (1988年9月) 参照）。この方法を利用して、原型を作製することができる。原型は装置として直接使用して大量に製造することができるか、あるいは鋳型として用いて装置を大量に複製するために利用するツールを製作することができる。

装置を作製する別法はLIGA法であり、ムンヒマイヤーらの報告（D. Munchmeyer et al., Rev. Sci. Instrum., 63(1), 1992）に記載されている。X線シンクロトロン源を利用してフ

ォトレジストに照射する。フォトレジストを現像すると原型が形成され、それをニッケルで電気メッキして鋳型キャビティを形成することができる。次に、液体ポリマーをニッケル鋳型中で型どりするかあるいは注入することができる。この方法を用いて、直接分析装置を製造するかあるいは原型からツールを製作することができる。

本発明の装置を製造する別の方法としては、フォトリソグラフィ、反応性イオンエッチングおよびイオンビームフライス加工でフォトレジストその他の材料に適切な構造体を決定する方法等の半導体製造法を利用するものである。その方法を行って、装置を直接製造することができたり、あるいはその方法を行ってツールを作製し、それから多量の装置を製造することができる。

本発明の装置を製造するさらに別の方法は、装置を微細加工するというものである。微細加工には、微細ツールを利用してスチール、プラスチック、合成および非合成ポリマー、シリコンウェハ、ならびにその他の金属、セラミックスおよびガラスなど（これらに限定されるものではないが）の材料に流路を刻む工程が関与する。これらの方法を行って、装置を直接製造す

ることができるか、あるいはその方法を行ってツールを作製し、そのツールから大量の装置を作製することができる。

本発明の分析装置を大量生産するために作製されるツールは上記の方法から製造することができる。ツールは、電気メッキなどの手段（これに限定されるもの

ではないが) によって製造することができる。この方法により、ニッケルなどの硬いツールを得て、原型を複製する。

ツールを作製したら、型押し、射出成形、反応射出成形、鋳造および圧縮成形(これらに限定されるものではない) によって分析装置を大量生産することができる。型押しでは、加熱した耐久性ツールを加熱したポリマー基板に押しつける。別法としては、低温のツールを加熱したポリマー基板に押しつけることができる。射出成形は、溶融ポリマーを用いて鋳型キャビティ中に注入するものである。反応射出成形では、液体樹脂を注入して、それが化学的プロセスによって固体化するものである。鋳造は、低圧成形プロセスを用いる。圧縮成形は、加熱したツールを用い、それによって装置の溶融および成形を行うものである。

2 本発明の装置の形状

一般に本発明の装置は、被験サンプルが最初に入る入口ポートを有するものである。一般に流路は毛管であり、被験サンプルを入口ポートから装置、捕捉部位を提供する構造体アレイおよび装置中の気体を排気する排出口などのベント(vent)を通過させる。さらに、チャンバおよび別の毛管を加えて、装置を特製のものとすることができる。一般に、装置を通る被験サンプルの運動は、毛管力に基づくものである。さらに、1以上の毛管を用いて、被験サンプルを入口ポートから流路まで送ることができる。さらに、1以上の毛管を用いて、装置の構造体部分から排出することができる。しかしながら、毛管力に代えて、あるいは毛管力との併用で差圧を利用して、装置中で流体の流動を起こすことができる。

排出口に代えて、自己排気材料を利用して、装置中の気体を排気し、装置中への酸素取り込みを行うことができる。装置内で、酸素を反応(例: オキシダーゼ反応) に利用することができる。自己排気材料および分析装置でのその利用については、1993年12月29日出願の米国特許出願08/174973号および同時係属中の1994年4月18日出願

の米国特許出願08/229256号(これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

流路は、隣接する構造体間に形成され、流体がそこを通過して流れることができる。流路および構造体の設計はいずれも、構造体表面と流体分子との間の接触を至適化する上で重要である。通常、流路の深さは約 $1\ \mu\text{m}$ ～ 約 $1\ \text{mm}$ の範囲である。流路の平均幅は通常、約 $0.02\ \mu\text{m}$ ～ $20\ \mu\text{m}$ の範囲である。構造体の高さは通常、約 $1\ \mu\text{m}$ ～ $1\ \text{mm}$ の範囲であり、平均幅は通常、 $1\ \mu\text{m}$ ～ $1\ \text{mm}$ の範囲である。デッドゾーンが低減されるか排除される限りにおいて、構造体アレイをいかなる数でも選択することができる。構造体アレイの好ましい形状は、菱形のアレイ、八角形のアレイ、六角形のアレイなどの一つのアレイで配置されているものである。好ましい構造体は、デッドゾーンを低減するものである。図1、2、3および4には構造体の好ましい形状を示してある。さらに、構造体の複数の部分をひと続きに配置しても良い。そのひと続きのアレイを、毛管によって互いにつなぐことができる。

本発明の装置で行われるアッセイは、構造体表面での捕捉を至適化するものである。本願に記載の方法を利用することによ

って、捕捉部位の幾何的構造を緻密に制御して、捕捉の均一性および効率を向上させる。流路が狭く深く、しかも構造体表面積が大きいと、分析物が拡散し、分析物捕捉が向上する。流路設計を被験サンプル中の対象物の拡散に基づいて行って、構造体表面での固定化試薬と相互作用するようにする。通常は、対象物は流路の断面にランダムに分配される。対象物は構造体表面に分配されて、そこで固定化試薬と相互作用することができる。

固定化試薬は、構造体表面や毛管および／またはチャンバ中で共有結合的もしくは非共有結合的に付着することができる。試薬を徐放試薬、空間的に隔たった試薬として施すか、あるいは表面にコーティングして乾燥させることができる。そのような表面への固定化試薬付与法は当業者には公知である。

本発明の装置を利用する方法には、特異的結合要素が関与する。検出法では、蛍光染料または着色粒子などの着色標識の結合を行うことができる。別法として、検出において、着色生成物を生成することができる酵素の結合を行うことができる。

装置は毛管その他のチャンバに基づいて、流体の運動を制御することから、内部チャンバの寸法の正確な制御が必須である。

本発明の装置は、凝集アッセイ、競争的アッセイ、非競争的アッセイおよびサンドイッチアッセイにおいて、糖およびコレステロールなどの標準的臨床化学検査アッセイで利用することができる。アッセイは、分離手段が不要な均一系であっても、あるいは分離段階を行う不均一系であってもよい。通常は、本発明の装置で行われるアッセイは均一系である。

本発明の装置では、1以上の別の流路を使用することができる。被験サンプルを入口ポートから移動する毛管は異なった経路すなわち構造体への主要経路と別途(alternate)経路に枝分かれしている。別途経路は、分岐点からある程度の距離で主要経路に再度合流することができる。別途経路の流体抵抗が主要経路とほぼ同等である場合、被験サンプルの流れは、装置のどちらの経路にも同等に進む。別途経路が主要経路より実質的に高い流体抵抗を有する場合、別途経路での流れの方が遅くなる。別途経路が主要経路より低い流体抵抗を有する場合、別途経路での被験サンプルの流れの方が大きくなる。流れの断面積、表面張力、排気(venting)および被験サンプルの粘度を変えることによって、流体抵抗を各経路内で変化させることができる。これらのパラメータおよび距離によって、主要経路への再合流

時間を決定することができる。別法として、各別途経路を、互いに独立の流速で、それ自体の独立の構造体アレイに直接流れるようにすることができる。それにより、複数の捕捉部位が可能となり、単一の試験部位で複数の分析物の存在または量を同時に測定することができる。

別途経路は、試薬と被験サンプルとを混合するための領域を設けることができる。例えば、チャンバを試薬添加領域として使用することができる。1以上のチャンバを、別途経路および主要経路に設けることができる。

さらに、装置経路に捕獲装置を入れて、ある一定の大きさ以上の流体成分を除去することができる。例えば、本発明の装置にセパレータを組み入れて、例えば

全血から血漿または血清を分離することができる。例えば、親水性の焼結多孔質材料の基質の表面に、赤血球凝集剤を塗布することができる。基質は、装置において、構造体の前方に設けることになると考えられる。全血サンプル中の赤血球は基質の隙間に捕獲され、実質的に赤血球を含まない血清または血漿が基質を通過して、毛管現象によって装置の構造体部分に移動する。米国特許4933092号が本願に、参照により全文組み込まれる。

本発明の装置の利点は、該装置によって、極微量の被験サンプルで分析物の存在または量を調べることができるという点である。例えば、全血サンプルからの極微量の血清または血漿を用いて、分析物を検査することができる。

検出対象分析物を含む被験サンプルは、入手源から得られたままで直接使用される流体であることができるか、あるいは各種方法で前処理して、その特性を変えることができる。次に被験サンプルを、装置の受容部分に連絡する入口ポートから装置中に導入する。装置の受容部分はチャンバまたは毛管である。次に、被験サンプルは毛管を介して移動する。被験サンプルは毛管中、構造体前方のチャンバまたは構造体表面で1以上の試薬と接触し得る。試薬には、検出可能な信号が発生し得る系を関与させることができる。

液体の被験サンプルを用いて、被験サンプルが毛管現象または差圧によって妥当な流速を持つようにすることができる。毛管現象または差圧が被験サンプル輸送の駆動力であることは理解しておくべき点である。毛管現象は、(1) 気体、流体が流れる表面および流体の表面エネルギー、(2) 毛管流路の寸法および(3) 排気効率という3つの重要な因子によって決まる。

毛管流と差圧流のいずれの場合の流速も、毛管またはチャンバの幾何形状および流体の粘度によって影響される。流速はさらに、差圧の増減によっても影響され得る。差圧付与の方法には、手動、モーター、ポンプ、減圧などによるものがあるが、これらに限定されるものではない。

被験サンプルの粘度が高すぎる場合、それを希釈して、妥当な流動時間を得ることができる毛管流速を得て、アッセイの時間を制御することができる。

被験サンプルは、血液、血清、血漿、唾液、眼球レンズ液、脳髄液、膿汁、汗、滲出液、尿、母乳などの生体液等（これらに限定されるものではない）の入手源から得ることができる。被験サンプルには、抽出、添加、分離、希釈、濃縮、濾過、蒸留、透析など（これらに限定されるものではない）の前処理を行うことができる。生体液以外に、他の液体被験サンプルを用いることができ、対象成分は液体あるいは液体媒体に溶解もしくは懸濁させた固体とすることができる。

使用される被験サンプル媒体は天然媒体であることができるか、あるいは被験サンプルを液体媒体中に導入して、毛管現象および検出可能信号に必要な所望の特性を与えることができる。

添加剤および溶媒を被験サンプル媒体に加えて、酸素化、安定性および流動性を増減することができる。

検出方法としては、色、光吸収もしくは光透過の変化、pH、導電率、蛍光、物理相の変化などがあるが、これらに限定されるものではない。

被験サンプルが検出系の検出可能成分を提供することができるか、あるいはそのような成分を加えることができる。その成分は、検出系の性質に応じてかなり変動する。そのような検出方法の一つでは粒子を利用し、その粒子が光を散乱するかあるいは流速変化を起こすものである。粒子には、細胞、液体系とは混和性のないポリマー粒子、ラテックス粒子、活性炭粒子、金属粒子、多糖類もしくは蛋白粒子、セラミック粒子、核酸粒子、凝集粒子などがあり得るが、これらに限定されるものではない。粒子の選択は、検出方法、分散の分散性もしくは安定性、不活性性、流動変化への関与 (participation) などによって決まる。

捕捉部位での特異的結合要素への分析物の結合は、装置における被験サンプルの圧力をモニタリングすることによって適宜検出することができる。例えば、流路を出入りする被験サンプ

ルに接続した圧力検出器によって、流路での流れの制限を起こす分析物によって起こる圧低下を検出することができる。

別の検出法には、ハイブリッド形成アッセイなどがある。構造体表面をポリヌ

クレオチドプローブなどの固定化試薬でコーティングすることができる。補体である分析物ポリヌクレオチドの固定化ポリヌクレオチドプローブへの結合については、蛍光標識プローブなどの標識プローブを加えて、分析物ポリヌクレオチドに結合させることができる。蛍光の量は、被験サンプル中の分析物量に正比例する。別法としては、ハイブリッド形成アッセイを、ポリヌクレオチドを検出可能標識に接合させる競争的形態で行うことができる。ポリヌクレオチド標識試薬は、固定化ポリヌクレオチドへの結合に関して、分析物と競合する。

捕捉部位での分析物の特異的結合要素との反応は、凝集によって検出することができる。例えば、捕捉部位で分析物または分析物／特異的結合要素錯体に結合することができる蛍光もしくはルミネセンス標識分子を用いて、被験サンプル中の分析物の存在または量を検出することができる。例えば、捕捉部位での血球の凝集を、被験サンプルの血液型についての陽性検査として役立てることができる。構造体表面の固定化試薬が凝集を

誘発することで、血液型についての陽性検査を行う。

本発明の装置で、ルミネセンスを検出することができる。例えば、ルミネセンス発光は、マイクロプレート読取装置を用いて容易に検出することができる。分析物は、分析物に結合し得る2つの抗体を有する特異的結合要素によって検出することができ、その場合1個の抗体をフルオレセインで標識して発光させ、第2の抗体をローダミンで標識して光を吸収させることができる。ローダミン標識抗体およびフルオレセイン標識抗体のそれぞれが分析物に結合する場合、フルオレセインの消光を観察して、分析物の存在を示すことができる。別の例としては、フルオレセイン抗体を捕捉部位に固定するものである。次に、分析物およびローダミン標識抗体を捕捉部位に搬送し、フルオレセインの消光を観察して、分析物の存在を示す。

さらに別の検出系では、化学的検出を行うことができる。例えば、グルコース測定は、媒体の吸収または反射率の変化とグルコース濃度とを関連づけるものである。グルコース測定のある通常の方法は、4-アミノアンチピリン(4-AAP)およびジクロロヒドロキシベンゼンスルホネート(DCHBS)とともにグ

ルコースオキシダーゼ (GOD) およびペルオキシダ

ーゼ (POD) とを用いて、尿または血清中のグルコース濃度を測定するものである。全ての試薬をゼラチンなどの水で膨潤し得る基質中に入れ、構造体上に堆積させる。構造体表面には、ポリエチレンテレフタレート (PET) などの透明薄膜を積層する。通常は血清または尿である被験サンプルを入口ポートに投入する。被験サンプルに接触すると、構造体上に堆積したゼラチンが膨潤して、グルコースと反応する試薬を放出する。グルコースと反応すると、吸光度、反射率または肉眼観察によって測定できる可溶性の赤色染料が生成する。

別法として、PODまたはGODを構造体上に固定化することができ、4-AAPおよびDCHBSを被験サンプルとともに導入して、反応を開始することができる。

場合によっては、グルコース、コレステロールまたは類似の分析物についてのアッセイで、着色形成試薬を固定化するのが簡便である。その場合、バラスト (ballast) 基すなわち長鎖アルキル基を染料分子のある部分に付加させて、可溶性を低下させることができる。バラスト基を組み込むことによって可溶性を低下させた染料分子の例は、サートル (Thirtle) の論文 (the Principles and Chemistry of Color Photography,

Thirtle, J.R. in the Theory of the Photographic Process, 4th Edition., T.H. James, Ed., MacMillian Publishing Co., Inc., New York., 1977, pp.369-372; 参照により本明細書に組み込む) に記載されている。バラスト化DCHBSの類似体を、構造体のある局所的領域のみで着色形成を起こすことができる構造体上に直接コーティングすることも考えられる。

検出はさらに、酵素を用いて行うこともできる。固定化試薬は、分析物に特異的に結合する。標識化試薬は、分析物に対する特異的結合要素に接合した酵素を有する。酵素に対する基質を加えることで、酵素と基質の間に酵素反応が起こる。検出・測定される酵素の量は、被験サンプル中に存在する分析物の量に相関し得る。例えば、診断アッセイ、特に特異的結合アッセイ方式の場合の酵素検出試

薬としては、アルカリ性ホスファターゼが一般に使用される。別法としては、標識試薬が、酵素と固定化試薬に特異的に結合する特異的結合要素を有するようにすることができる。酵素に対する基質を加えることで、酵素と基質との間に酵素反応を起こす。検出・測定される酵素の量は、被験サンプルに存在する分析物の量に相関し得る。

対象分析物は、アッセイの目的および被験サンプルの入手源

に応じてかなり多様である。分析物には、蛋白、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、脂質、核酸、微量元素、治療目的で投与されるドラッグおよび不正な目的で投与されるドラッグを含む薬剤、細菌、ウィルスおよび代謝物があり得る。分子の凝集も対象となり得るものであり、特にウイルス、ウィルス、単細胞生物などの原核細胞および真核細胞、リンパ球などの哺乳動物細胞、上皮細胞、腫瘍などの天然の凝集の場合である。さらに、天然の結合分子（例：抗体結合受容体）の存在する物質または結合分子を製造することができる物質であれば分析物となり得る。従って、抗原性物質、ハプテン、抗体、それらの組み合わせなども分析物となる。

特定の目的で、他の添加物を加えることもできる。特定のpHを維持するには、緩衝剤が望ましい場合がある。酵素阻害剤も加えることもできる。他の対象試薬としては、抗体、酵素、抗原、ペプチド、ビオチン／アビジン、保存剤、安定剤、活性化剤、酵素基質および補因子、酸化剤、還元剤などがあるが、これらに限定されるものではない。当然のことながら、添加する添加剤もしくは試薬は、アッセイ成績を妨害するものであってはならない。

さらに、対照手段を用いて、アッセイ結果を検証することができる。ある対照手段では、ほぼ自動的に、分析物検出アッセイと同時に行われる確認アッセイを含むものである。特定の実施態様では、分析物を含む被験サンプルを所定量の標識試薬と接触させて、分析物／標識試薬錯体を含む混合物を形成する。得られた混合物を毛管現象によって装置を通して移動させる。第1の手順では、混合物は固定化した抗分析物特異的結合要素を有する捕捉部位と接触し、特異的結合要素

が分析物／標識試薬錯体と結合する。この捕捉部位は被験サンプル捕捉部位である。第2の手順では、混合物は最初に陽性対照試薬を含む試薬領域と接触する。陽性対照試薬は、被験サンプル分析物と同じ標識試薬に対する結合特異性を有する移動性の特異的結合要素である。陽性対照試薬は、被験サンプルのものと同一の分析物であるか、あるいは相当する分析物類似体であることができる。混合物が陽性対照試薬領域と接触すると、陽性対照試薬が再生され、未結合の標識試薬と特異的に結合して陽性対照試薬／標識試薬錯体を形成する。この錯体は、陽性対照捕捉部位に移動する。陽性対照捕捉部位には、第1の手順と同じ固定化抗分析物特異的結合要素が含まれている。従って、陽性対照捕捉部位

は、検出可能な固定化錯体を形成することができる。陽性対照捕捉部位での検出可能信号により、アッセイ試薬が機能性を有し、試験結果が妥当であることが確認される。例えば、被験サンプル中に分析物が存在しない場合には、陽性対照捕捉部位に検出可能な信号があり、被験サンプル部位に検出可能信号がない場合に、被験サンプルが陰性であるという結果が、妥当な試験結果であると確認される。被験サンプル中に分析物が存在する場合には、陽性対照捕捉部位に検出可能信号があり、被験サンプル捕捉部位に検出可能信号がある場合に、患者サンプルが陽性であるという結果が、妥当な試験結果であると確認される。陽性対照捕捉部位自体に検出可能信号がない場合は、標識系の試薬が分解したか、あるいは被験サンプル中の他の因子が陽性対照試薬に対する標識試薬の結合あるいは陽性対照捕捉部位にある固定化特異的結合要素に対する標識陽性対照錯体の結合を妨害したことを示している。

本発明の装置にはさらに、別の対照機構および／または領域を組み込んで、例えばアッセイ終了を指示することもできる。これらの他の対照機構は当業者には公知である。

装置は、試薬の添加、濾過などに使用することができる各種

領域や、毛管現象および差圧によって別個に流体の流れを駆動する別個の領域を有することができる。

本発明の分析装置を利用するアッセイの種類は数多くある。サンドイッチアッセイでは、抗原に対する親和性を有する特異的結合要素を有する標識試薬を固定化特異的結合要素／分析物錯体に結合させる。信号応答は、分析物濃度に正比例する。

競争アッセイでは、分析物と標識試薬との間に競争を起こさせる。信号応答は、分析物濃度に反比例する。

本発明の装置は、キュベットの形で製造することもできる。構造体は、透明窓を有し捕捉部位での捕捉を機器で検出できるような容器内に設けることができる。キュベットを分光光度計内に設置して、読みとることができる。例えば、本発明の装置の表面部にピルチャー・ハミルトン・フィルム (Pilcher Hamilton Film; Pilcher Hamilton Corporation, Greer, S.C., 29651) の最上層を設けることで、キュベットを構成することができる。入口ポートは最上層に設けることができるか、あるいは装置の一部のままにしておくことができる。両面粘着テープ (3M Corp., St. Paul, MN., 55144) を、最上層表面に付着させた。被験サンプルを入口ポート内に入れることができ、捕

捉部位で捕捉が起こる。

本発明の装置は、アッセイ細片の形態で製造することもでき、アッセイ細片の一端を、分析物を含む被験サンプル液と接触させる。被験サンプルは毛管現象によって装置を通過して移動し、構造体での分析物の捕捉が起こる。そのような装置は液浸棒の形で製造することもできる。本明細書に、参照により、米国特許 5 2 0 0 3 1 7 号の全文が組み込まれる。

本発明の装置は、1 個の分析装置で、複数の分析物を調べることもできる。構造体の異なった領域および／または独立の領域を設けて、それぞれに対して、個々の分析物および／または標識試薬に結合するそれら領域に施してある異なった分析物に対して特異的な固定化試薬を持たせることができる。構造体の独立の領域はひと続きに配置することができるか、あるいは複数経路で配置することができる。機器をプログラムして、各種領域を独立に読みとることができる。そのような 1 例としては、構造体のある領域に抗ベンゾイルエコグニン抗体を固定化し、

、構造体の別の領域には、抗カンナビノイドを固定化し、構造体の別の領域には抗アンフェタミン抗体を固定化した乱用薬物アッセイがある。これら3薬剤のいずれかもしくは全ての代謝物

および／または分子を含む被験サンプルは、それらの個々の領域に結合する。陽性および陰性の検出は、肉眼的および／または機器的に行うことができる。異なった分析物について調べる構造体の各領域には、その分析物用に特異的試薬を固定化することができる。

3. 拡散による対象物捕捉のための流路設計

以下に、分析物捕捉のための構造体を利用する本発明の装置における捕捉効率を概算するのに必要な式をまとめてある。これらの式は、流路の任意の断面の幾何形状に適用するよう一般化したものである。これらの式は、非常の多様な流路設計に対応したものではない。これらの式は一般的な設計に適用されることから、捕捉効率についての数値的な予測を直接提供するものではない。その代わり、流路の断面形状を最初に決め、相当する流体速度分布 $U(y, z)$ を標準的な方法を用いて予め計算しなければならない。次に、それら2つの値を式に代入することで、捕捉効率についての固有の数値的近似値を誘導し、流路長さ (L)、対象物径 (d) および壁面の反応係数 (k) などのパラメータと関連させることができる。数値結果を容易に求めることができる流路断面の例としては、矩形

形状および円形形状の2つがある。しかしながら、評価できる断面形状の種類に関しては制限はない。

これらの式によって示唆される分析上の仮定を、以下に全て記載してある。これらは、式が妥当である流路設計および流動条件の範囲を規定するものである。

計算についての主な仮定

1. 定常状態流体条件

流体（対象物を含有するもの）が流路を完全に満たし、流体速度が経時変化しない。

2. 非圧縮性層流

この仮定は、検討される全種類の液体および流速値に適用可能である。

3. 希釈対象物濃度レベル（5容量%未満）

これは、対象物の存在とは独立に流体の速度分布についての解を求めることができるもので、流体の移動時に対象物間に考慮すべき相互作用が起こらないことを保証するものである。

4. 流路断面形状および寸法は、流路長さ全体にわたって一定である（これにより、捕捉領域での流体通過の収束や発散が除外される）。

これは、全ての流体は専ら流路の方向に流れ、長さ方向に速度変化がないことを示唆するものである。

一般式（3次元）

$C = C(x, y, z)$ = 局所対象物濃度レベルとした場合、流体の対流効果および拡散効果による流路内での懸濁対象物の定常状態輸送は、下記式の通りである。

$$\phi U_x^* \frac{\partial C}{\partial x^*} = \left(\frac{\bar{W}}{L} \right)^2 \frac{\partial^2 C}{\partial x^{*2}} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^{*2}} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^{*2}} \quad \phi = \frac{\bar{U} \bar{W}^2}{DL}$$

正規化空間座標および流路内での正規化流体速度は、下記式の通りである。

$$\begin{aligned} x^* &= x/L & U_x^* &= U_x / \bar{U} \\ y^* &= y/\bar{W} \\ z^* &= z/\bar{W} \end{aligned}$$

流路壁に接触する対象物の結合速度式は以下の通りである。

$$\left\{ n_y \frac{\partial C}{\partial y^*} + n_z \frac{\partial C}{\partial z^*} = (k\bar{W})C \right\} @ \left\{ \begin{aligned} y^* &= y_{wall}^* + \frac{d}{2\bar{W}} n_y \\ z^* &= z_{wall}^* + \frac{d}{2\bar{W}} n_z \end{aligned} \right.$$

流路に進入し、流路を出る対象物の流速は以下の通りである。

$$\dot{N}_{in} = (\bar{U} \bar{W}^2) \oint_{inlet} U_x^* C \, dy^* dz^* \quad \dot{N}_{out} = (\bar{U} \bar{W}^2) \oint_{exit} U_x^* C \, dy^* dz^*$$

対象物捕捉効率値は以下の通りである。

$$\varepsilon = \frac{\dot{N}_{in} - \dot{N}_{out}}{\dot{N}_{in}} = f \left(\phi, \frac{d}{\bar{W}}, \frac{\bar{W}}{L}, k \bar{W}, U_x^*, C_{inlet} \right)$$

流路長さ方向での捕捉された対象物の局所密度は以下の通りである。

$$\rho(x) = N_{in} \frac{\partial \varepsilon}{\partial x} = N_{in} \frac{\partial \varepsilon}{\partial \phi} \frac{d\phi}{dx} = -N_{in} \frac{\partial \varepsilon}{\partial \phi} \frac{\bar{U} \bar{W}^2}{D x^2}$$

記号の定義

C : 流路内で懸濁した対象物の局所濃度レベル = $f(x, y, z)$

x : 流路流動方向 (流路壁に平行) の空間座標

y, z : 流路流動方向に直交する空間座標

\bar{W} : 特徴的流路幅値

L : 流路長さ

d : 対象物径

D : 流体内部での対象物の拡散係数

k : 流路壁での対象物の結合反応係数

ϕ : 流路分散パラメータ

\bar{U} : 流路平均流体速度

U_x : 流路流体速度プロファイル = $f(y, z)$

n_y : 流体方向に向かう流路壁上の単位法線ベクトル (ベクトルの y 成分)

n_z : 流体方向に向かう流路壁上の単位法線ベクトル (ベクトルの z 成分)

ε : 流路の対象物捕捉効率値

$\rho(x)$: 流路長さ方向の捕捉対象物の局所密度 (対象物 / 単位長さ)

N_{in} : 流路に入る対象物の総量

拡散による対象物捕捉を最大とするための装置設計のガイドラインは、流路幅

および流速を最小とし、構造体の捕捉表面積を最大とすることである。特定の構造体設計を行うことで、流体のデッドゾーンを低減することができる。それにより、構造体表面の固定化試薬を流体の流れに対して曝露することができる。

さらに、本発明の装置は、容量測定的な流体流速制御の側面を持つ。他の毛管駆動式の装置では、流体が装置を通過するに

連れて流速の経時的低下を示し、その結果捕捉効率の経時変化が生じる。本発明では、毛管寸法の低下、断面積の変化または湿潤性変化を考慮して、装置における総サンプル流速を経時的に安定した状態とすることができる。本発明の装置における容量測定的な流速制御により、捕捉効率を制御することができる。

本発明を利用するアッセイを、以下の実施例において説明する。これら実施例は本発明の実施の態様たるべきものであり、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。これら実施例において、構造体は装置の幅方向に列状に配置されている。実施例2～5では、被験サンプル中の分析物についての陽性結果により、捕捉部位において、装置の幅で肉眼観察できる棒線が生じる。

実施例 1

構造体を抗 β -ヒト甲状腺刺激ホルモン (h T S H) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL., 60064) の 2 m g / m L 溶液 0. 5 μ L でコーティングし、37℃で90分間インキュベーションする。次に、構造体を1 m g / m L のウシ血清アルブミン (B S A) の 3 - [N - モルホリノ] プロパンスルホン酸 (M O P S) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.,

63178) 緩衝液溶液 (p H 7. 0) で上塗りし、少なくとも4時間インキュベーションする。次に構造体をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中で洗浄して、未結合蛋白を除去する。

ポリスチレン構造体の最上部に、裏面が粘着性のビステックス (Vistex) コーティングしたポリカーボネート薄層を積層する。

h T S H 校正物質 50 μ L のサンプルを、セージ・インストルメント・シリンジ・ポンプ (Sage Instruments Syringe Pump, Cole-Parmer Instruments, Ch

icago, IL., 60648) 駆動の $250\ \mu\text{L}$ のハミルトン注射器 (Hamilton Co., Reno, NV., 89502) にて、流速 $0.55\ \mu\text{L}/\text{分}$ で装置の入口ポートに注入する。サンプルは、微粒子表面に接合した抗 $\alpha\text{-hTSH}$ (Abbott Laboratories) を有する溶液 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR., 97402) 中、直径 $282\ \text{nm}$ の橙赤色蛍光微粒子とともに予備混合する。

混合物には、 0.1% の微粒子溶液 1 部、IMx (登録商標) 希釈液 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.) 2 部および hTSH 校正物質 6 部 ($50\ \mu\text{L} = 6$ 部) を含有させる。アッセイは約 5 分間行う。

$485\ \text{nm}$ 励起フィルター、 $505\ \text{nm}$ 二色フィルターおよび $560\ \text{nm}$ 発光フィルターを通して像形成した $2\ \text{mm}$ スリットビームを用いる反射率計を用いて装置を分析する。微粒子は最大励起波長 $505\ \text{nm}$ を持ち、 $560\ \text{nm}$ で最大蛍光を有する。 100 ポイント/ mm のサンプリング速度で全長 $15\ \text{mm}$ にわたって部分の走査を行う。構造体に結合した抗 $\beta\text{-hTSH}$ 抗体による微粒子捕捉は、サンプル中の hTSH 濃度に正比例する。

実施例 2

黒色のポリピロール粒子を、B 型肝炎表面抗原に対するポリクローナルヤギ抗体 (抗 HBsAg) でコーティングする。コーティングしたポリピロール粒子を、装置の構造体前方のチャンバ表面に塗布する。構造体表面には、マウスモノクローナル抗 HBsAg 抗体を固定化する。マウスモノクローナル抗体は、ポリクローナルヤギ抗体とは異なった表面抗原エピトープに対して反応性である。

HBsAg を含有する被験サンプルを、チャンバにつながった装置の入口ポートに加える。被験サンプルを、コーティングしたポリピロール粒子と混合することで、被験サンプルの

HBsAg が抗 HBsAg をコーティングした粒子に特異的に結合する。毛管現象により、抗原-抗体粒子錯体がチャンバから構造体アレイに移動する。抗原-抗体粒子錯体は、被験サンプル HBsAg の量に比例して捕捉部位に蓄積する。黒色棒線 (バー) 形成を肉眼で調べて、被験サンプル中の HBsAg の存在を示

す。

実施例 3

黒色のポリピロール粒子を、組換えHBsAg抗原でコーティングする。コーティングしたポリピロール粒子を、装置の構造体前方のチャンバ表面に塗布する。構造体には、異なった組換えHBsAg抗原がコーティングしてある。抗HBsAg抗体を含む被験サンプルを、チャンバにつながった装置入口ポートに加える。被験サンプルを、コーティングしたポリピロール粒子と混合することで、被験サンプルの抗HBsAg抗体が組換えHBsAgをコーティングした粒子に特異的に結合する。毛管現象により、抗原-抗体粒子錯体がチャンバから構造体アレイに移動する。ポリピロール粒子は、被験サンプル抗HBsAg抗体の量に比例して捕捉部位に蓄積する。黒色棒線形成によって、被験サンプル中の抗HBsAg抗体の存在を決定する。

実施例 4

黒色ポリピロール粒子を、HIV-1およびHIV-2のいずれにも共通のp41組換えHIV抗原でコーティングする。コーティングしたポリピロール粒子を、装置の構造体前方のチャンバ表面に塗布する。構造体には、HIV-1ウィルスとHIV-2ウィルスの両方からの組換えp41抗原とp24抗原をコーティングする。

抗HIV抗体を含有する被験サンプルを、チャンバにつながった装置入口ポートに加える。被験サンプルを、コーティングしたポリピロール粒子と混合することで、粒子にコーティングされた組換えHIV抗原に特異的な被験サンプルの抗HIV抗体が結合する。毛管現象により、抗体-抗原粒子錯体がチャンバから構造体アレイに移動する。

ポリピロール粒子は、被験サンプルの抗HIV抗体の量に比例して捕捉部位に蓄積する。黒色棒線形成の肉眼検査によって、被験サンプル中の抗HIV抗体の存在を示す。

実施例 5

黒色ポリピロール粒子を、HIV-1とHIV-2の両方に共通のHIV抗原

に特異的なモノクローナル抗体混合物でコー

ティングする。構造体は、H I V - 1 ウィルスとH I V - 2 ウィルスの両方に共通のH I V 抗原に特異的なモノクローナル抗体の混合物でコーティングする。

H I V - 1 ウィルスとH I V - 2 ウィルスの両方に共通のH I V 抗原を含有する被験サンプルを、装置入口ポートに加えて、被験サンプルを毛管現象によって構造体アレイのところまで移動させる。被験サンプル中のH I V - 1 ウィルスとH I V - 2 ウィルスの両方に共通のH I V 抗原は、構造体表面にコーティングされたモノクローナル抗体に特異的に結合する。コーティングしたポリピロール粒子のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 溶液を入口ポートに加え、毛管現象によって構造体のところまで移動させ、そこで、ポリピロール粒子は捕捉部位で捕捉されたH I V 抗原に特異的に結合する。

ポリピロール粒子は、被験サンプルのH I V 抗原の量に比例して捕捉部位で蓄積する。黒色棒線の形成を肉眼で調べることで、被験サンプル中のH I V 抗原の存在を示す。

実施例 6

ポリヌクレオチドを蛍光 (フルオレセイン) 標識粒子に付着させる。コーティングした蛍光粒子を、装置の構造体の前方に

あるチャンバの表面に塗布する。構造体にも、対象ヌクレオチドに対して補体となるポリヌクレオチドをコーティングする。

被験サンプル中に存在するか、あるいはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) もしくはリガーゼ連鎖反応 (L C R) を介して増幅しておいた対象のヌクレオチドアレイを含有する被験サンプルを、装置入口ポートに加え、そこで被験サンプルはチャンバに移動する。被験サンプルをポリヌクレオチドコーティングした蛍光粒子と混合することで、被験サンプルの対象ヌクレオチドは補体ポリヌクレオチド蛍光標識粒子に結合する。毛管現象によって、ヌクレオチド-補体ポリヌクレオチド-蛍光粒子錯体はチャンバから構造体アレイに移動する。

錯体は、被験サンプルの対象ヌクレオチドの量に比例して、捕捉部位で補体ポ

リヌクレオチドに結合する。

実施例 7

ポリアニオン性材料を、H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の H I V 抗原に特異的なモノクローナル抗 H I V 抗体の混合物に加える。ポリアニオン性材料を、装置の構造体の前方にあるチャンバ表面に施す。構造体を、ポリグルタミン酸などのカチオン性溶液で処理する。

H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の H I V 抗原を含有する被験サンプルを装置入口ポートに加え、そこで被験サンプルは毛管現象によってチャンバに移動する。被験サンプルを、ポリアニオン性材料に結合した抗体と混合することで、H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の被験サンプルの H I V 抗原は抗体に特異的に結合する。毛管現象により、H I V 抗原 - 抗 H I V 抗体 - ポリアニオン錯体がチャンバから構造体アレイに移動する。

ポリアニオン性材料は、構造体表面のカチオン性材料によって捕捉される。H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の H I V 抗原に対して特異性を有する抗 H I V 抗体に結合した蛍光（フルオレセイン）標識粒子を、装置入口ポートに加える。毛管現象によって、抗 H I V 抗体に結合した標識粒子が、装置の構造体まで移動して、捕捉部位で捕捉された H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の H I V 抗原に結合する。

抗 H I V 抗体に結合した蛍光標識粒子は、H I V - 1 と H I V - 2 の両方に共通の被験サンプルの H I V 抗原の量に比例して捕捉部位に蓄積する。

【 図 1 】

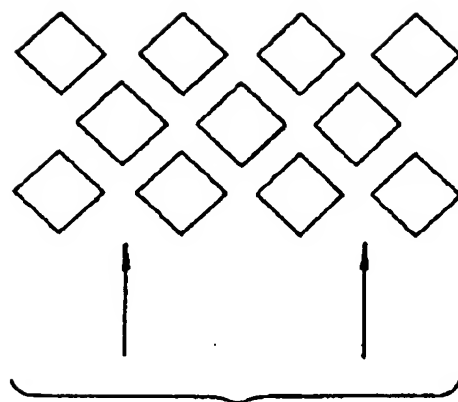


FIG. 1

【 図 2 】

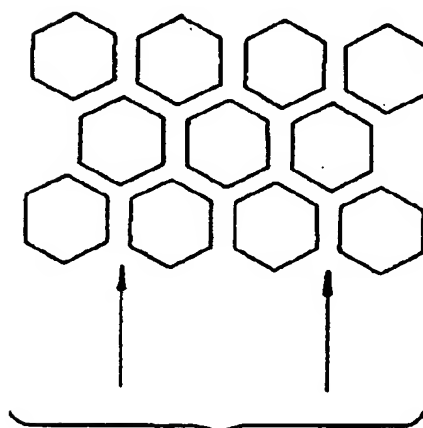


FIG. 2

【 図 3 】

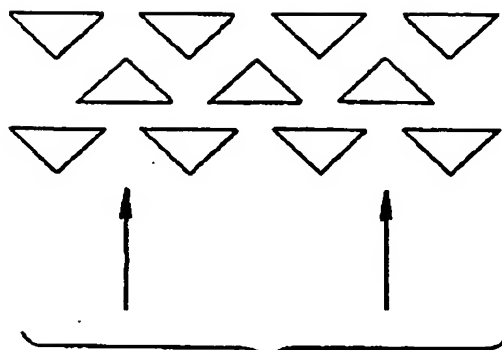


FIG.3

【 図 4 】

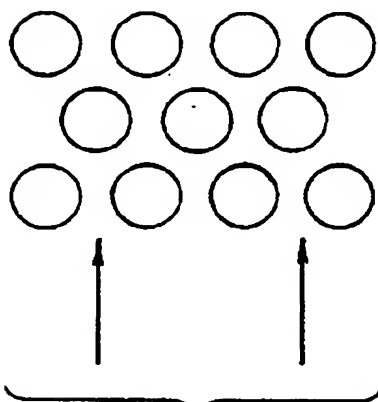


FIG.4

【 図 5 】

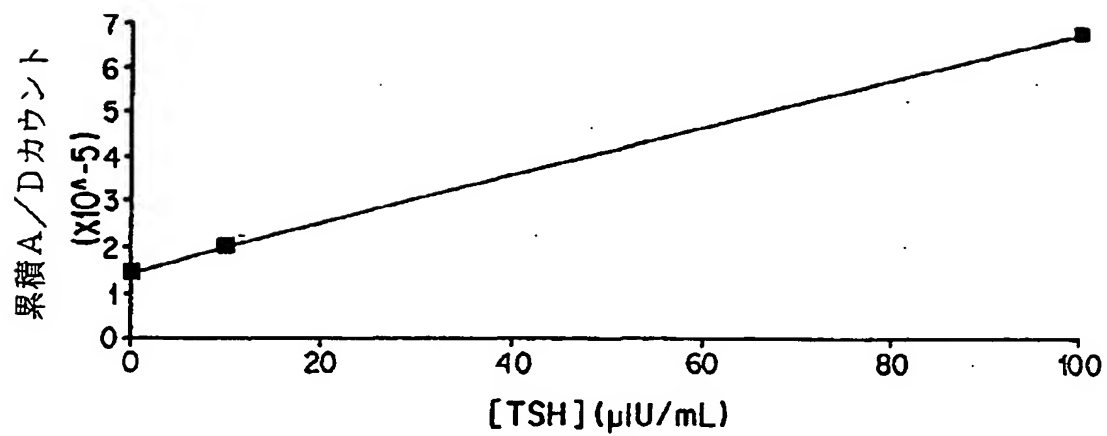


FIG.5

【 図 6 】

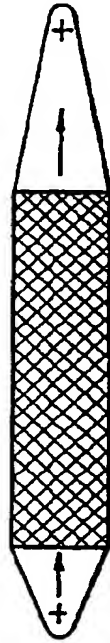


FIG.6

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/543 B01L3/00 G01N33/53		International Application No. PC, /US 95/12462
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N B65D B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,4 789 628 (P.N. NAYAK) 6 December 1988 cited in the application see the whole document	1-5,7,12
A	---	6,8-11
X	WO,A,93 22053 (UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 November 1993 cited in the application see page 26, line 11 - page 28, line 21 see page 31, line 10 - line 16; claims 11-5,7,12	1-5,7,12
A	see the whole document -----	6,8-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 February 1996		Date of mailing of the international search report 16.02.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PC1/US 95/12462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4789628	06-12-88	NONE	
WO-A-9322053	11-11-93	US-A- 5304487	19-04-94
		US-A- 5296375	22-03-94
		AU-B- 4222393	29-11-93
		AU-B- 4222593	29-11-93
		AU-B- 4222693	29-11-93
		AU-B- 4222793	29-11-93
		AU-B- 4223593	29-11-93
		CA-A- 2134474	11-11-93
		CA-A- 2134475	11-11-93
		CA-A- 2134476	11-11-93
		CA-A- 2134478	11-11-93
		EP-A- 0637996	15-02-95
		EP-A- 0637997	15-02-95
		EP-A- 0639223	22-02-95
		EP-A- 0637998	15-02-95
		EP-A- 0637999	15-02-95
		JP-T- 7506430	13-07-95
		JP-T- 7506431	13-07-95
		JP-T- 7506256	13-07-95
		JP-T- 7506257	13-07-95
		JP-T- 7506258	13-07-95
		WO-A- 9322054	11-11-93
		WO-A- 9322421	11-11-93
		WO-A- 9322055	11-11-93
		WO-A- 9322058	11-11-93
		US-A- 5427946	27-06-95
		US-A- 5486335	23-01-96

フロントページの続き

- (72)発明者 ローリー、マイケル・ジー
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、ワイ
ルドウッド、ロイヤル・オーク・レーン・
33720、ナンバー・201
- (72)発明者 オースタ、ギャリー・エム
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガー
ニー、アツシユウツド・レーン・5377
- (72)発明者 ルーミス、ニール・ダブリュ
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・63403、
レシーン、サウス・ウイスコンシン・アベ
ニュー・1730
- (72)発明者 シヤイン、エリツク・ビー
アメリカ合衆国、イリノイ・60022、グレ
ンコー、グローブ・ストリート・459
- (72)発明者 シアファイラ、トーマス・ジー
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・53104、
ブリストル、ワンハンドレッドセブンス・
ストリート・21616